

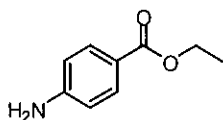
Licence Science Technologie et Santé – S5
Techniques Chromatographiques

2ème session Vendredi 17 juin 2022 Durée 2h

*Sans document ni téléphone portable – Calculatrice autorisée –
Les réponses devront être clairement justifiées*

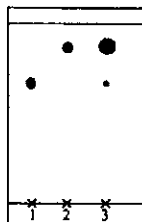
Exercice 1.

La benzocaïne est le principe actif de médicaments pouvant soulager la douleur et est notamment présent dans certaines pommades.



Sa synthèse a été réalisée en faisant réagir l'éthanol avec l'acide 4-aminobenzoïque.

En fin de synthèse, une chromatographie sur couche mince sur une plaque d'aluminium recouverte de silice a été réalisée. La plaque obtenue après révélation est représentée ci-dessous:



dépôt 1 : acide benzoïque

dépôt 2 : benzocaïne pure

dépôt 3 : solide obtenu en fin de synthèse

- 1) Donner l'équation de la réaction. Quel est le nom général de cette réaction ?
- 2) Indiquer avec précision le type de chromatographie utilisée.
- 3) Justifier l'ordre de sortie des composés sur la plaque CCM.
- 4) Déterminer le Rf du produit le plus polaire.
- 5) Quel type de détection a pu être utilisé ici ? Expliquer sa mise en œuvre.
- 6) Le produit obtenu en fin de synthèse est-il pur? Justifier votre réponse. Quelle solution proposez-vous ?

Exercice 2.

1^{ère} partie.

L'équipe de Jing Zhao à Pékin en Chine a décrit dans le journal Food Chemistry (X.F. Xue, J.H. Zhou, L.M. Wu, L.H. Fu, J. Zhao, *Food Chemistry*, 2009, 115, 715-719. HPLC determination of adenosine in royal jelly) une méthode de détermination de l'adénosine dans la gelée royale.

Certains paragraphes ainsi que la Figure 3 de cette publication sont reportés ci-dessous.

ABSTRACT

A simple method is described for the determination of adenosine in royal jelly. The adenosine in the sample was extracted using 80% ethanol and analysed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic separation was performed using a Dionex HPLC system with a Waters Symmetry C18 column and gradient elution with a mixture of two solvents: solvent A, 0.4% phosphoric acid and solvent B, methanol. The effluent was monitored using a UV detector set at 257 nm. The average recoveries were 91.6–98.3% ($n = 6$) with standard deviation below 5.3%. The limits of detection and quantification were 0.017 and 0.048 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The method has been successfully applied to the analysis of royal jelly samples. For 45 royal jelly products, the adenosine content varied from 5.9 to 2057.4 mg/kg.

1. Introduction

Royal jelly (RJ) is a secretion from the hypopharyngeal and mandibular glands of worker bees (*Apis mellifera*) and is involved in the sexual determination of the queen bee (Nagai & Inoue, 2004). Some studies have reported the composition of RJ. The main components are water, proteins, sugars, lipids and other substances (Crane, 1990; Palma, 1992; Piana, 1996a). As a result of the increasing interest in RJ with respect to human health, the authentication of new active ingredients in RJ is becoming the subject of an increasing number of studies.

2.2. HPLC

HPLC analysis was carried out using a Dionex HPLC system (Dionex, USA), which included a P680 pump, an ASI-100 auto injector, a TCC-100 column oven and a 170UV UV detector, connected to Chromeleon software. A Symmetry C18 column (250 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μm) from Waters was used. The column temperature was maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$. The standards and samples were separated using a gradient mobile phase consisting of 0.4% phosphoric acid (A) and methanol (B). The linear gradient conditions were: 0–25 min, 90% A; 25–35 min, 20% A; 35–40 min, 90% A and 40–65 min, 90% A. The flow rate was set at 0.9 ml/min and the injection volume was 20 μl . The detection wavelength was set at 257 nm. Identification of adenosine was based on retention time when co-injected with standards.

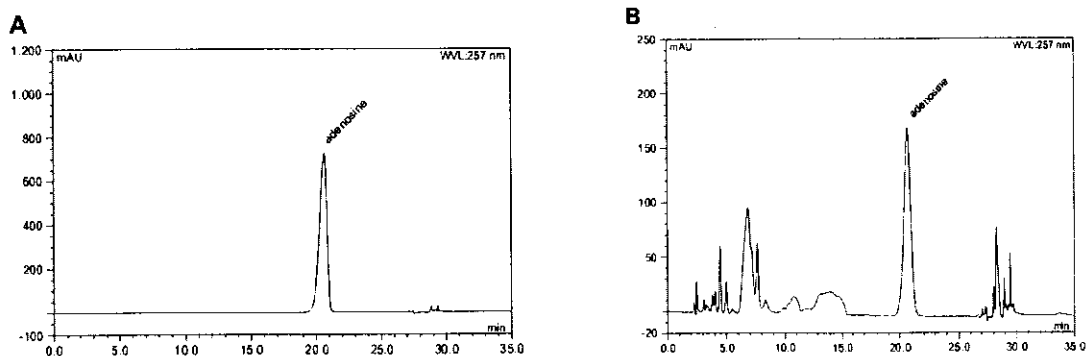


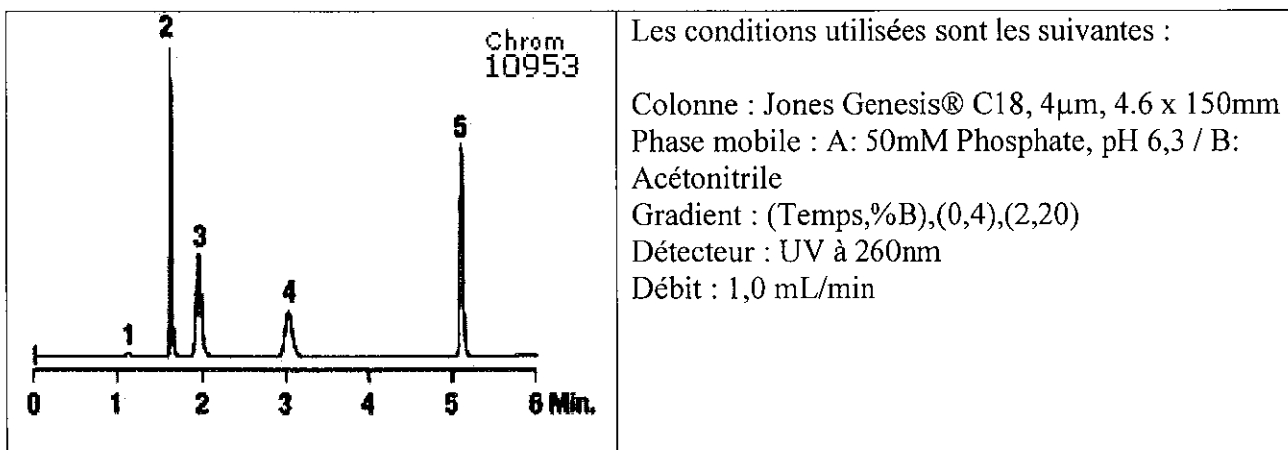
Fig. 3. Typical HPLC–UV chromatograms of (A) adenosine standard and (B) actual samples.

- 1) Pourquoi les auteurs se sont-ils intéressés à la détection et au dosage de l'adénosine dans la gelée royale ?
- 2) A l'aide d'un schéma, décrivez l'appareillage utilisé dans cet article.
- 3) Quel type de colonne a été utilisé ? Dans quel type de chromatographie se trouve-t-on ?
- 4) Selon les informations que vous possédez sur la méthode de détection utilisée, que pouvez-vous en déduire des éléments de structure de l'adénosine ? Aurait-il été possible d'utiliser un autre détecteur ?
- 5) Quel est le temps de rétention de l'adénosine ?
- 6) Proposez une méthode pour diminuer le temps de rétention de l'adénosine.
- 7) Que pourriez-vous faire pour être certain que le pic du chromatogramme B (Figure 3) noté adénosine est bien celui de l'adénosine ?

2^{ème} partie.

Sur le site internet de Grace®, qui est un fournisseur d'équipement de chromatographie, on trouve de nombreux spectres HPLC illustrant les temps de rétention obtenus pour un grand nombre de produits en fonction des conditions chromatographiques utilisées (colonne, phase mobile...).

Ainsi, ils présentent la séparation de 4 nucléosides naturels Cytidine (2), Uridine (3), Guanosine (4) et Adénosine (5) sur le spectre reporté ci-après.



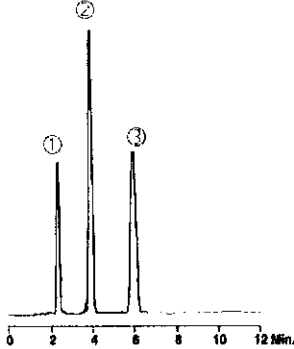
- 8) Que pouvez-vous dire concernant la polarité des 4 nucléosides étudiés ?
- 9) Si vous avez un mélange de Cytidine, Uridine et Adénosine à doser, quelle méthode pourriez-vous utiliser ? Expliquez brièvement comment vous procéderiez.

Exercice 3

On cherche à déterminer la composition en 1-butanol (Téb: 117,7°C) et 1-pentanol (Téb: 138°C) d'une solution A par Chromatographie en Phase Gazeuse, en utilisant une colonne capillaire.

Trois injections ont été réalisées :

1 ^{ère} injection : Solution A, (V = 0,5 µL)	deux pics: le premier aux environs de 2 min; le deuxième vers 6 min	
--	--	--

2 ^{ème} injection : Solution B, (V = 0,5 µL)	trois pics	<table border="1"> <thead> <tr> <th>t_R (min)</th> <th>Aire</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2,37</td> <td>545711</td> </tr> <tr> <td>3,98</td> <td>515265</td> </tr> <tr> <td>6,00</td> <td>504524</td> </tr> </tbody> </table>	t _R (min)	Aire	2,37	545711	3,98	515265	6,00	504524
t _R (min)	Aire									
2,37	545711									
3,98	515265									
6,00	504524									
3 ^{ème} injection : Solution C, (V = 0,5 µL)		<table border="1"> <thead> <tr> <th>t_R (min)</th> <th>Aire</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2,37</td> <td>552555</td> </tr> <tr> <td>3,98</td> <td>893554</td> </tr> <tr> <td>6,00</td> <td>864225</td> </tr> </tbody> </table>	t _R (min)	Aire	2,37	552555	3,98	893554	6,00	864225
t _R (min)	Aire									
2,37	552555									
3,98	893554									
6,00	864225									

Solution A : solution de 1-butanol et 1-pentanol à doser

Solution B : solution de 1-butanol, 2-méthyl-1-butanol et 1-pentanol. Les trois alcools sont présents en quantité connue : m_{1-butanol} = 0,384 g, m_{2-méthyl-1-butanol} = 0,423 g, m_{1-pentanol} = 0,388 g

Solution C : solution A (m_A = 0,477 g) et de 2-méthyl-1-butanol (m_{2-méthyl-1-butanol} = 0,333 g)

- 1) En justifiant votre réponse, identifiez l'ordre d'élution du 1-butanol et du 1-pentanol.
- 2) A l'aide d'un schéma, décrivez l'appareillage utilisé.
- 3) Quel est le rôle du 2-méthyl-1-butanol ?
- 4) Quel est le temps de rétention du 2-méthyl-1-butanol dans les conditions de l'analyse ?
- 5) Déterminer la teneur en 1-butanol et 1-pentanol de la solution A.

Exercice 4

On cherche à séparer le mélange d'acides aminés suivant : Valine, Alanine, Leucine, Serine sur une résine échangeuse d'ions. Pour cela on utilise des billes de polystyrène portant des groupements SO₃⁻. Le dépôt est réalisé à pH = 2 et on élue avec une solution dont on augmente graduellement le pH entre 2 et 7.

- 1) Quel est le type de résine utilisée ?
- 2) Quel est l'ordre d'élution observé ? (Justifier votre réponse)

Données : Valeurs de pK à 25°C des acides aminés

	pK ₁	pK ₂
Val	2,29	9,74
Ala	2,35	9,87
Leu	2,33	9,74
Ser	2,19	9,21

I Parmi les composés suivants, lequel ne peut pas réagir comme nucléophile ? Justifier.

a) MeNH_2 , b) Me_2NH , c) Me_4N^+ , d) Me_3N

II Parmi les composés suivants, lequel est le meilleur nucléophile ? Justifier.

a) CH_3OH , b) CH_3O^- , c) $(\text{CH}_3\text{OH}_2)^+$, d) HO^-

III L'acétonitrile est un solvant : (Justifier)

a) polaire, b) protique, c) susceptible de former des liaisons hydrogène, d) hydrophile

IV Classer par ordre de basicité, de nucléophilie et d'aptitude nucléofuge les composés (ou ions) suivants :

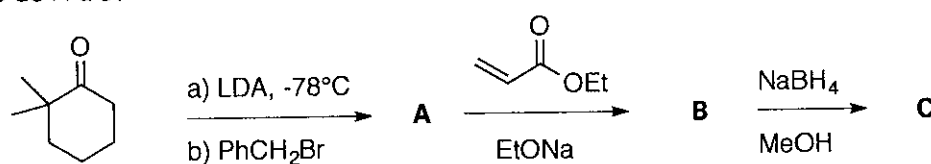
a) ROH , RO^- , CH_3CO_2^-

b) I^- , Cl^- , Br^-

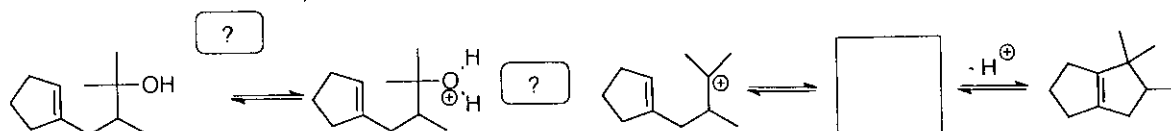
c) RSH , ROH , RO^- , RS^-

d) F^- , H_2N^+ , HO^-

V Compléter la séquence réactionnelle suivante. Quel est le nom de la réaction permettant le passage de A à B?



VI a) Sur le schéma suivant, compléter les trous. Indiquer la présence des doublets non liants, remplir les cases vides, ajouter des flèches réactionnelles si nécessaire et décrire les mouvements d'électrons par des flèches adéquates.



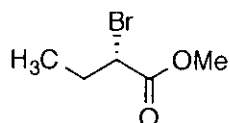
b) préciser le rôle de l'alcène dans la réaction ayant lieu à partir du carbocation intermédiaire (acide/base/nucléophile/électrophile ?).

c) Pourquoi obtient-on à la fin l'alcène le plus substitué ?

VII La réaction du 1-iodo-2-phényléthane avec de la soude aqueuse au reflux conduit à deux composés après purification, le styrène (vinylbenzène) et le 2-phényléthanol.

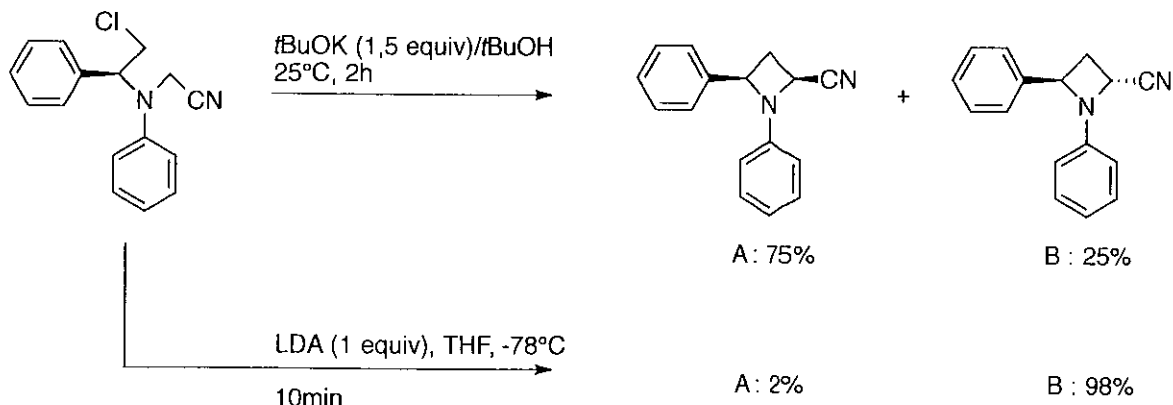
- Préciser le mécanisme de formation de l'alcool
- Préciser le mécanisme de formation de l'alcène
- La formation de l'alcène est-elle un mécanisme unimoléculaire ?
- La formation de l'alcool correspond-elle à une hydratation ?
- La nature du solvant peut-elle favoriser la formation d'un produit aux dépens de l'autre ?

VIII Le (2S)-2-bromobutanoate de méthyle A réagit avec le cyanure de potassium (KCN) dans le DMF (diméthylformamide) pour conduire au composé B.



- Le mécanisme de la réaction est-il de type S_N1 ou S_N2 ? Justifier
- Est-ce que la vitesse de cette réaction est de la forme $v = k [A][CN^-]$?
- La réaction se fait-elle avec inversion de configuration ?
- Quel est le rôle du DMF ?

IX On considère la réaction suivante mise en œuvre avec des conditions opératoires différents à partir du même substrat :



- Ecrire le mécanisme général de cette réaction dans les deux cas connaissant les valeurs de pK_a pour le LDA (36) et le $tBuOK$ (17). Préciser pour chaque étape s'il s'agit d'une réaction à priori réversible (double flèche réactionnelle) ou irréversible (simple flèche).
- Quelle est la relation d'isomérisie entre A et B ? Ont-ils les mêmes propriétés physico-chimiques ?
- Identifier le produit cinétique et le produit thermodynamique. Justifier.

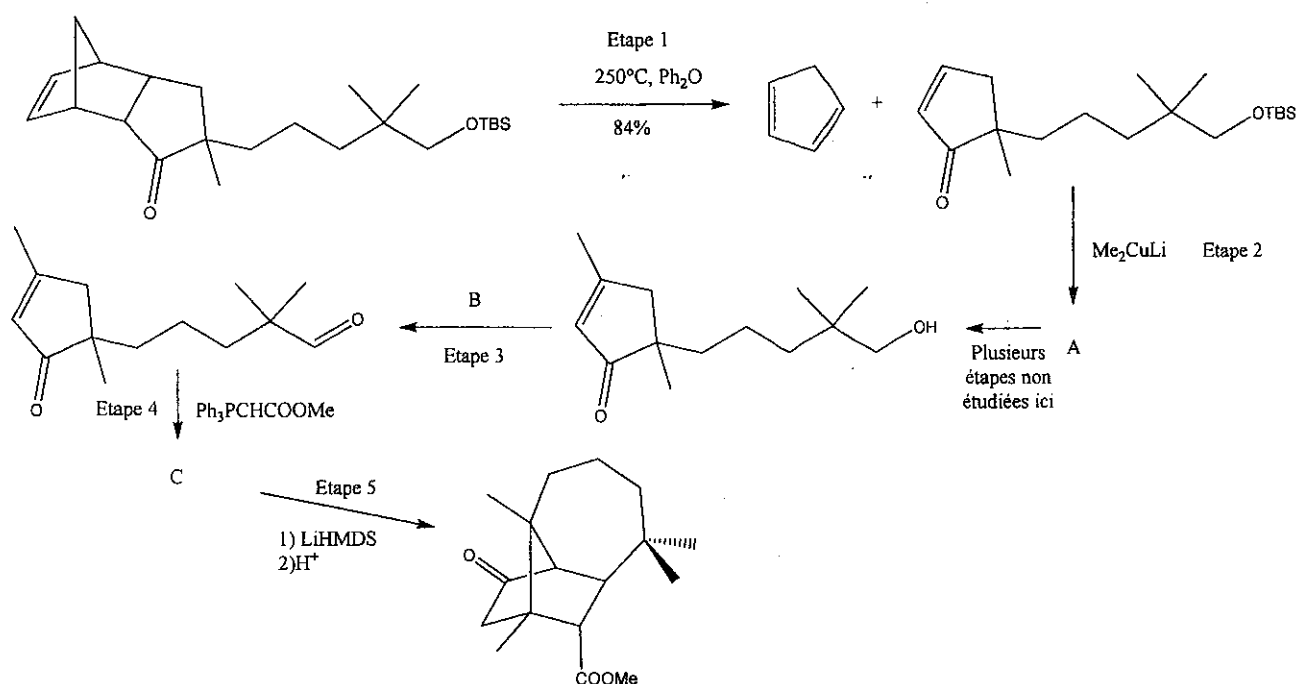
Synthèse organique 1

Session 2 2021-2022

Partie 1 (Pour indication 1h20)

Exercice 1 : Synthèse D'un précurseur de la (±)-CULMORINE

La culmorine est un produit naturel appartenant à la famille des sesquiterpènes. Cette molécule possède un squelette tricyclique original de type [6.3.0.0]undécane.

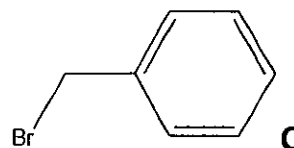


1. L'étape 1 est une rétro cycloaddition bien connue. Donner le nom de la réaction inverse de l'étape 1.
2. Dans l'étape 2, de quelle réaction s'agit-il ? Ecrire la structure du produit **A** après hydrolyse.
3. Si on avait remplacé, le réactif de l'étape 2 par MeLi, aurait-on obtenu le même produit ? Si non, donner la structure attendue après hydrolyse.
4. Donner les conditions réactionnelles **B** dans l'étape 3. De quel type de réaction s'agit-il ?
5. Donner le nom de la réaction de l'étape 4. Ecrire la structure du produit **C** ainsi que le mécanisme de sa formation.
6. Proposer une synthèse en 2 étapes du réactif Ph₃P-CH=COOMe.

L'étape 5 conduit enfin au dérivé de culmorine (pas de commentaire demandé).

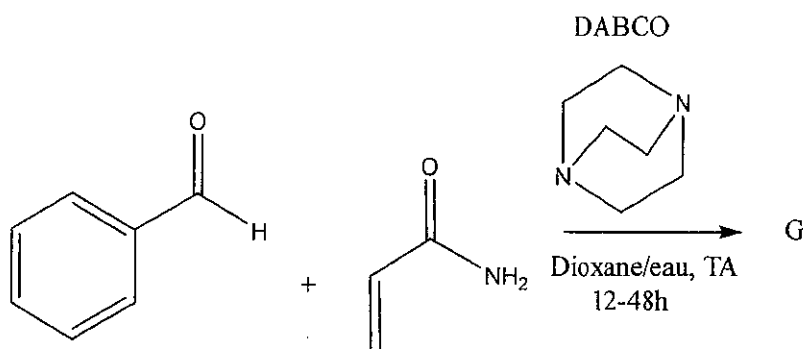
Exercice 2

L'action du magnésium sur **C**, dans l'éther anhydre, donne **D**.



1. Quel est le nom de ce réactif **D**?
2. Comment peut-on passer de **D** à l'alcool primaire **E** possédant un carbone supplémentaire ? Indiquer le mécanisme de la réaction.
3. On oxyde **E** en l'aldéhyde correspondant **F**. Indiquer les conditions opératoires de votre choix ainsi que le mécanisme de la réaction choisie.

Exercice 3 : Un article a pour titre "Successful Baylis Hillman Reaction of Acrylamide with Aromatic Aldehydes", C. Yu, L. Hu, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 219-223.

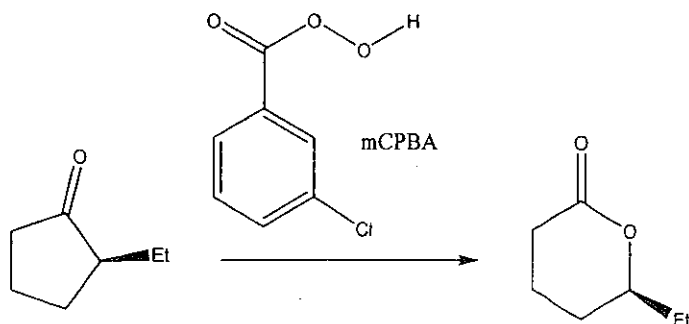


En vous aidant de vos connaissances concernant cette réaction, proposer un mécanisme et une structure pour le produit **G**.

Comment s'appelle cette réaction si à la place du DABCO nous décidons d'utiliser une phosphine (PPh_3 par exemple) ?

Exercice 4

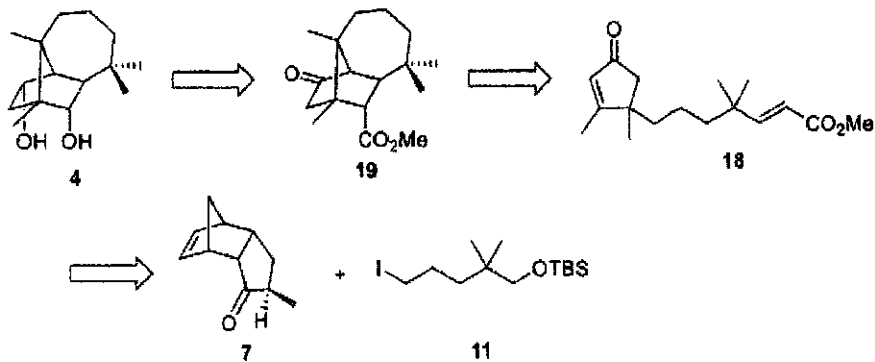
Donner le nom de la réaction suivante et rappeler ses caractéristiques en termes de régiosélectivité et stéréosélectivité. Donner le mécanisme impliqué.



Partie 2 (Pour indication 0h40)

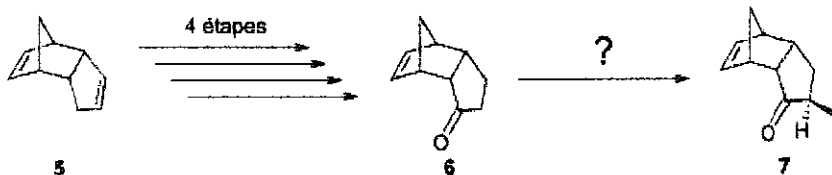
Exercice 1

La (-)-culmorine a été isolée pour la première fois comme métabolite secondaire du champignon *Fusarium culmorum*. Elle présente une activité antifongique vis-à-vis d'une grande variété de champignons, en particulier contre des souches du blé et du maïs. Nous nous proposons d'étudier dans ce problème une des synthèses totales de la (±)-culmorine développée par le groupe de Ihara.³ La synthèse proposée repose sur l'approche rétrosynthétique suivante :



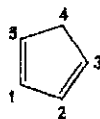
³ Takasu, K. ; Mitzutani, S. ; Nogushi, M. ; Makita, K. ; Ihara, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4112-4119.

Nous nous intéresserons ici seulement à la synthèse du fragment 7.



1. Par analogie avec le schéma 4, écrire l'équation de la dimérisation du cyclopentadiène pour obtenir le produit 5.
2. À quelle réaction chimique correspondent ces réactions ?
3. Ecrire le mécanisme de la réaction.
4. Quels autres diastéréoisomères aurait pu être obtenu ?

On donne ci-dessous les orbitales frontalières du cyclopentadiène :



OM	Energie	C1	C2	C3	C4	C5
HO	$\alpha + 0,62\beta$	0,37	-0,37	-0,60	0	0,60
BV	$\alpha - 0,87\beta$	-0,32	-0,32	0,60	-0,29	0,60

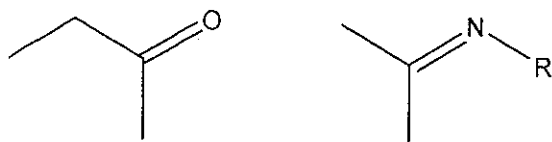
Note : Les paramètres α et β sont tous deux négatifs.

TABLEAU 2

- Représenter schématiquement les orbitales frontalières du cyclopentadiène.
- Pourquoi cette réaction peut-elle se faire à température ambiante ou en chauffant très légèrement ?
- À l'aide des orbitales moléculaires du cyclopentadiène, justifier la stéréosélectivité observée.

Exercice 2

Nous allons comparer la réactivité des liaisons C=O et C=N dans les composés suivants :



OM du groupe C=O

Energie	Atome C	Atome O
$\alpha + 1,6 \beta$	0,53	0,85
$\alpha - 0,6 \beta$	0,85	-0,53

OM du groupe C=N

Energie	Atome C	Atome N
$\alpha + 1,3 \beta$	0,61	0,85
$\alpha - 0,8 \beta$	0,79	-0,61

- Pour chaque système π , classer l'énergie de chaque OM et dire quel est la HO.
- Préciser dans chaque cas quelle orbitale intervient lors d'une attaque nucléophile sur ces groupements.
- Comparer la réactivité de C=O et C=N vis-à-vis d'une addition nucléophile.
- Justifier que le C (dans C=O ou C=N) soit le site d'attaque privilégié d'un nucléophile.